

UDC 616.98 : 578.828.6-097-08

Створення системи генної терапії СНІДу на основі антисенсових РНК

А. Д. Швед, О. П. Кухаренко

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

adshved@email.ua

На базі аденоасоційованого вірусу отримано плазмідну конструкцію, здатну до синтезу в клітині антисенсових РНК, спрямованих проти ключових генів ВІЛ. Гемопоетичні клітини людини, що несуть в собі створену конструкцію, набувають стійкості до ВІЛ-інфекції, що засвідчує зниження інфекційного титру ВІЛ у культурі клітин. Одержану систему внутрішньоклітинної резистентності до ретровірусу можна розглядати як модель генотерапії СНІДу.

Ключові слова: ВІЛ-СНІД, аденоасоційований вірус, антисенсові РНК, генна терапія, гемопоетичні клітини людини.

Розвиток методів секвенування та штучного синтезу нуклеїнових кислот, відкриття ферментів рестрикції і зворотної транскрипції, розробка техніки полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також розкриття природного механізму антисенсової регуляції експресії генів відіграли революціонізувальну роль у докорінній зміні уявлень щодо можливості молекулярної біології у вирішенні найактуальнішої проблеми всесвітньої науки – керованій регуляції генної експресії. Науково-практичні заходи в подоланні цієї проблеми набули цілеспрямованого характеру і розвивалися в двох напрямках: штучного синтезу антисенсових олігонуклеотидів і створення систем внутрішньоклітинного біосинтезу антисенсових РНК-транскриптів, комплементарних певним ділянкам мРНК обраного гена-мішені. Працюючи в межах української програми Національного Комітету боротьби зі СНІДом, у 90-ті роки минулого століття ми теж свої зусилля скерували у цьому напрямку.

Загальна стратегія, вироблена за кілька років досвіду використання асРНК для пригнічення репро-

дукції вірусів, передбачає деякі певні правила вибору гена-мішені в межах усього вірусного геному [1, 2]. Теорія й експерименти показують, що в більшості випадків ефективність асРНК у блокуванні відповідної мРНК залежить від їхнього молярного співвідношення в клітині протягом експресії [2, 3]. Отже, мішень у клітині має бути низькокопійною, щоб існувала можливість створення надлишку антисенсових транскриптів над кодуєчими вірусними мРНК. Саме тому дію асРНК доцільно спрямовувати на ранні вірусні гени, що кодуєть регуляторні фактори, копійність мРНК яких незначна. Це надасть більше шансів досягти надлишку асРНК і вплинути на кінетику її взаємодії з мРНК-мішенню на користь утворення гібриду сенс–антисенс.

Методом комп'ютерного аналізу опублікованих послідовностей багатьох ізолятів ВІЛ-1 за мішень для антисенсового впливу обрано іншу область – екзон TatARev з флангами, де перекриваються рамки зчитування ранніх регуляторних і пізніх структурних вірусних білків. Визначена ланка ВІЛ-геному кодує життєво важливі для продуктивної інфекції вірусу регуляторні білки та ключові генетичні сигнали і є консервативною для більшості ізолятів ВІЛ-1.

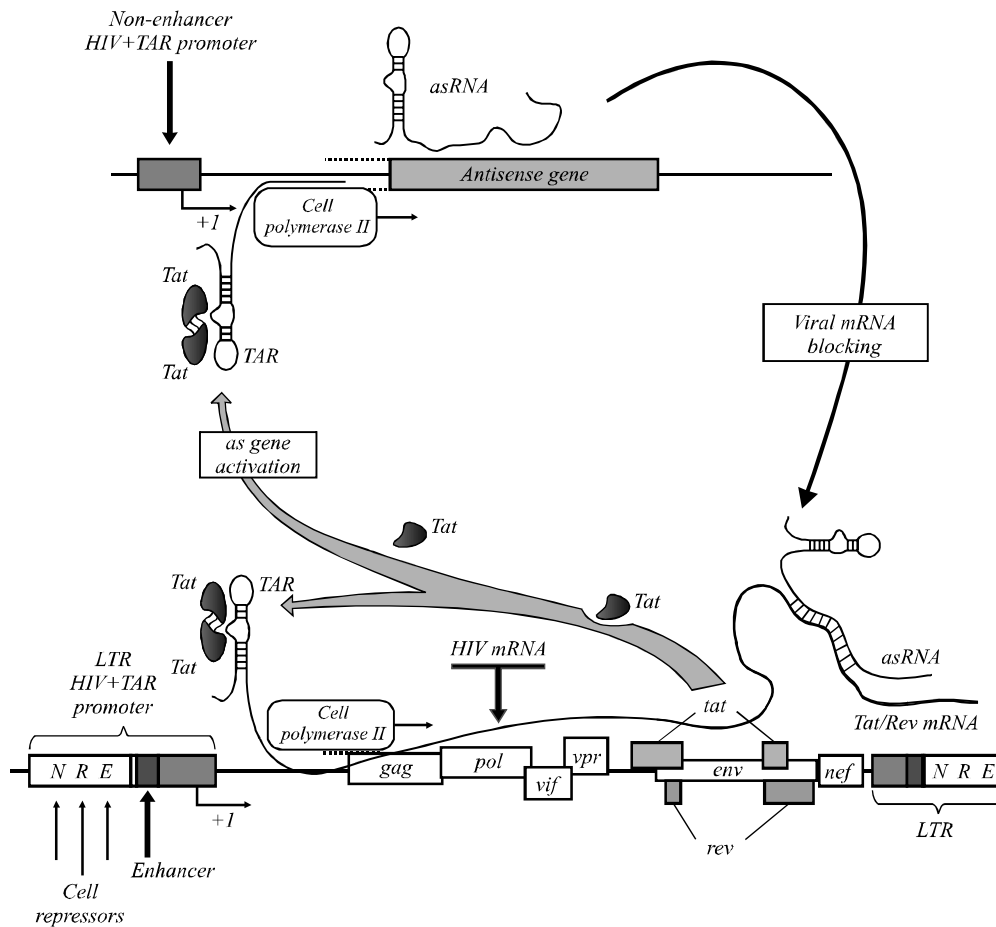


Рис. 1. Схема внутрішньоклітинної регуляції транскрипції антисенсових РНК проти *Tat/Rev* мРНК ВІЛ-1 та механізм негативного зворотного зв'язку з регуляторними генами вірусу. У верхній частині наведено антисенсовий ген, у нижній – геном провірусу ВІЛ-1 [4]

Наступним кроком у конструюванні гена асРНК став вибір промотору, який має направляти їхній синтез у клітині. Було вирішено, що для експресії противірусних антисенсових транскриптів доцільним буде реалізувати принцип зворотного зв'язку між антисенсовим геном і геномом ВІЛ-1. Це можливо, якщо синтез асРНК буде направлений промотором ВІЛ, який активується ранніми продуктами ВІЛ-геному, а саме – трансактиватором *Tat*. Тоді рівень експресії асРНК залежатиме від експресії найважливіших генів ВІЛ-1 (рис. 1), тобто у клітині має встановитися стан рівноважної протидії, де асРНК контролюють рівень ключових вірусних продуктів на підпороговому рівні та блокують тим самим перехід вірусної інфекції до продуктивної фази. Подібний принцип застосування власної транскрипційної системи промотору ВІЛ уже було із значним успіхом використано в інших лабораторіях [4] для

внутрішньоклітинної експресії деяких генів з анти-ВІЛ-активністю або надекспресії різних рекомбінантних генів з неспецифічною антивірусною активністю (інтерферони та ін.). У відповідності до визначених ознак було спроектовано безенхансерний промотор ВІЛ з потрійним тандемом елементів SP-1 транскрипційних факторів та TAR-елементом для взаємодії з ВІЛ-трансактиватором *Tat*. Такий промотор у нетрансформованій клітині є сильнішим за нативний, оскільки не піддається впливам негативних клітинних факторів. Секвенування створеного рекомбінантного промотору показало, що його послідовність відповідає транскрипційній одиниці ВІЛ з ТАТА-ініціатором, основними елементами ініціації транскрипції SP-1 та TAR-елементом (рис. 2).

За вектор ми обрали аденоасоційований вірус (ААВ) людини, переваги якого висвітлено у низці

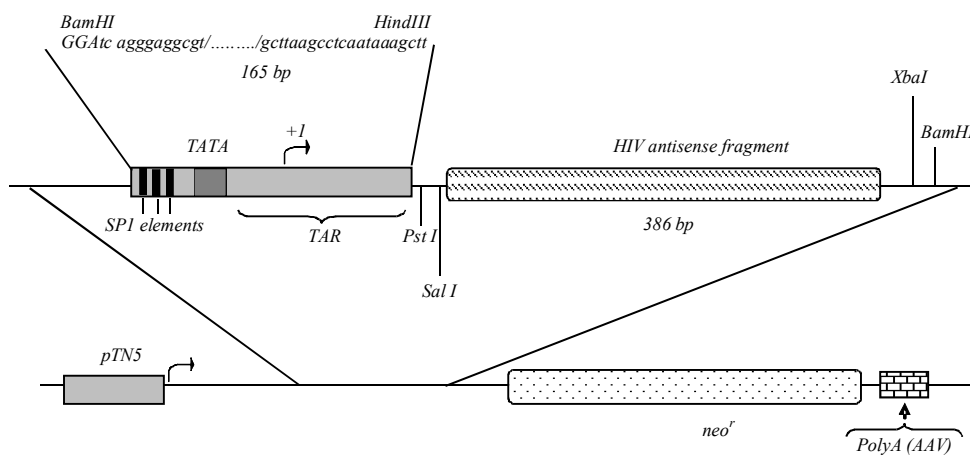


Рис. 2. Транскрипційна одиниця створеного антисенсового гена. 165-нуклеотидний фрагмент – безенхансерний промотор LTR ВІЛ-1 із сайтами зв’язування транскрипційних факторів SP-1, ТАТА-боксом та TAR-елементом промотору ВІЛ; +1 – старт транскрипції; 386-нуклеотидний фрагмент – послідовність геному ВІЛ, клонувана в антисенсовій орієнтації стосовно промотору ВІЛ [4]

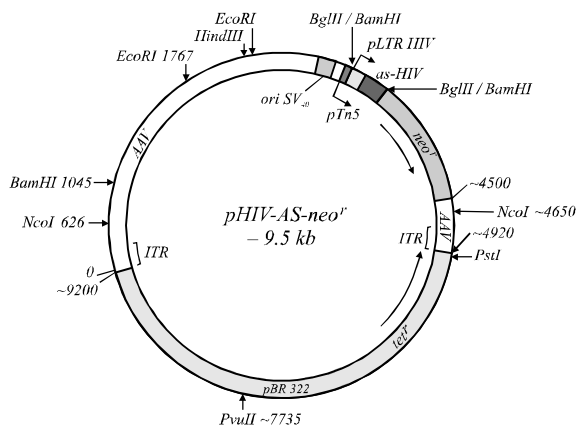


Рис. 3. Схема вектора *pHIV-as-neo'*, що експресує проти-ВІЛ асРНК

публікацій [5, 6]. Крім того, проектний вектор повинен нести селективний маркер для відбору трансфікованих клітин. Для цього традиційно обрано ген неоміцинофосфотрансферази, що забезпечує стійкість до аміноглікозидних антибіотиків *neo^r* і надає можливість вести селекцію трансфікованих клітин на середовищі з антибіотиком G418. Для термінації транскрипції асРНК нами використано власний термінатор векторного ААВ.

Створену антисенсову конструкцію *pHIV-as-neo'* представлено на рис. 3. Основою молекулярного вектора є геном ААВ, позбавлений генів структурних білків, та клонований у ген *amp^r* плазмиди *pBR322*. На місце генів структурних білків у вектор ААВ клонувано селективний ген *neo^r*, а також ВІЛ-антисенсовий ген. За трансфекції цієї плазмиди

у клітини послідовність ДНК, фланкована кінцевими повторами (ITR ААВ), повинна стабільно інтегрувати в хромосому гемопоетичних клітин людини. Транскрипція асРНК з цієї рекомбінантної конструкції забезпечується клонуванням і позбавленням енхансера власним промотором ВІЛ-1.

Секвенування клонованого фрагмента показало, що його послідовність відповідає транскрипційній одиниці ВІЛ з ТАТА-ініціатором, основними елементами ініціації транскрипції SP-1 та TAR-елементом, ефективність якого здатна підвищуватися білком Tat через TAR-елемент. Конститутивна експресія у цій конструкції посилена розташованим вище промотором Tn5. Таким чином, асРНК синтезується як складова частина мРНК гена *neo* у 5'-некодуючій його частині. Окрім антисенсового механізму пригнічення реплікації ВІЛ, який забезпечує створений антисенсовий ген, можна сподіватися на додатковий вплив на ВІЛ з боку білка Rep ААВ, про що в літературі вже сповіщалося [7–10], та елемента TAR, що також згадується в публікаціях як виконавча ланка механізму блоку реплікації ВІЛ під назвою TAR-decoy [11, 12].

Тестування чутливості інтактних гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини до ВІЛ-інфекції показало, що з 25 досліджених зразків клітин, ізольованих з різних ембріонів, лише у двох (зразки 7 і 10) синтез антигену р24 (рис. 4, а) та титри інфекційного вірусу (рис. 4, б) були порівняльними з цими показниками вірусної репродукції у стандартній культурі клітин МТ-4, яку традиційно використовують в експериментах з виділення і тит-

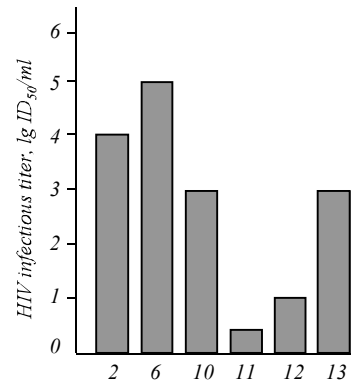
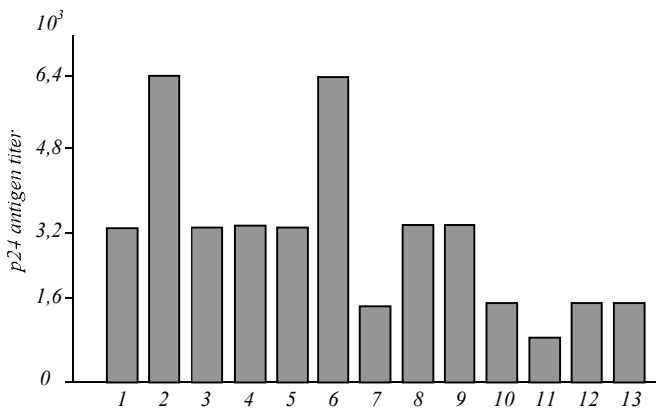


Рис. 4. Репродукція ВІЛ-1 у гемопоетичних клітинах ембріональної печінки людини: 1–12 – номери культур з різних ембріонів; 13 – клітини лінії МТ-4. Для ілюстрації наведено типові дані [14]

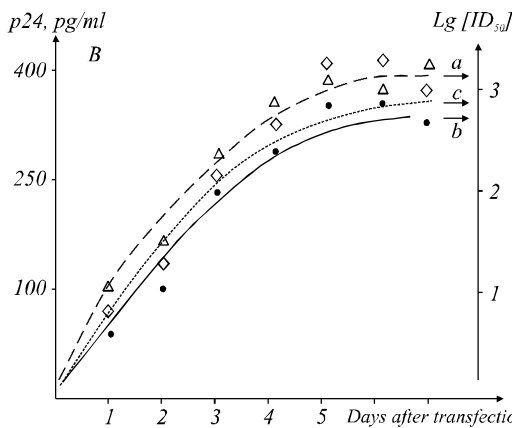
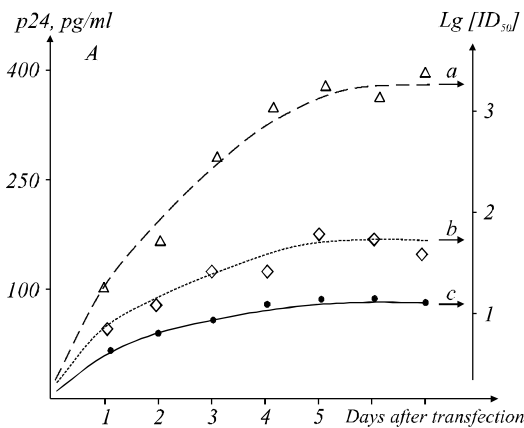


Рис. 5. Вплив антисенсової векторної конструкції на репродукцію ВІЛ у гемопоетичних клітинах: А – за присутності антибіотика G-418; Б – без антибіотика (а – нетрансфіковані клітини; б – клітини, трансфіковані векторною конструкцією *pDL52-91Neo*; в – клітини, трансфіковані антисенсовою векторною конструкцією *pHIV-as-neo*) [4]

рування ВІЛ. У наших дослідях інфекційний титр вірусу в 12-му зразку був нижчим за всі інші, а в 11-му – присутності вірусу не виявлено зовсім, що свідчить про значно вираженішу або цілковиту стійкість цих клітин до ВІЛ-інфекції. У культурах клітин з решти ембріональних зразків інфекційні показники були досить високими – інколи на 2 lg ID₅₀ перевершували титр ВІЛ у клітинах МТ-4 (рис. 4, б, зразки 2, 6).

Численні літературні джерела свідчать про те, що поряд з пацієнтами, у яких спостерігається типовий темп розвитку ВІЛ-інфекції, тобто бурхливий перехід до стадії СНІДу, існують і такі, у котрих цей процес проходить дуже повільно, з-поміж них невелика частина залишається здоровою, незважаючи на минулі, нерідко неодноразові, випадки інфікування. Виявлені в наших дослідях неоднакові показники стійкості до ВІЛ різних зразків гемопоетичних клітин дещо нагадують розподіл клінічних темпів розвитку інфекції, хоча точного їхнього збігу очікувати не варто через відсутність у нашому експерименті *in vitro* компонентів імунного за-

хисту макроорганізму. Однак можна стверджувати, що одержані дані на клітинному рівні опосередковано підтверджують існування природних механізмів стійкості до ВІЛ-інфекції.

Результати вірусологічних досліджень представлено на рис. 5. У клітинах, трансфікованих векторною плазмідом *pDL52-91Neo*, яка несе послідовності Рер-білка ААВ, але не має антисенсового фрагмента, за селективних умов культивування (з антибіотиком G418) відбувається пригнічення репродукції ВІЛ на 15–25 %. Ефект інгібування реплікації вірусу в даному досліді (контроль вектора) може бути зумовлений дією саме Рер-білка ААВ. У контрольному експерименті, де в клітини трансфікували плазмиду, яка містить лише ІТР ААВ (тобто не здатну синтезувати Рер-білок ААВ), помітного впливу на ВІЛ-інфекцію не відмічено. Це опосередковано підтверджує дані [7–10] про здатність ААВ-специфічного Рер-білка пригнічувати репродукцію ВІЛ.

При визначенні титру вірусу і продукції його антигену р24 у популяції клітин, трансфікованих антисенсовою плазмідом і культивованих за присут-

ності селективного антибіотика, спостерігали зменшення продукування антигену на 66 % і інфекційного титру ВІЛ на 99 % порівняно з культурами, що не несуть антисенсових конструкцій. Зниження інфекційного титру вірусу (на два порядки) є переконливим показником інгібіторної дії, проте рівень синтезу вірусспецифічного білка р24 у наших експериментах можна було б оцінювати з меншою мірою оптимізму. Однак аналіз отриманих даних свідчить про те, що ні в плануванні експерименту, ні в побудові генетичних конструкцій та їхніх випробуваннях суттєвих помилок ми не припустили. Аргументи на користь останнього твердження можна виокремити в наступних міркуваннях.

Найпереконливішим доказом проти-ВІЛ ефективності створеної антисенсової конструкції є саме показник суттєвого зменшення титру інфекційного вірусу в трансфікованих нею клітинах. АсРНК-транскрипти в розробленій нами системі спрямовані на пригнічення експресії регуляторних білків Tat і Rev ВІЛ, які, про що вже згадувалося вище, являють собою критичні ланки у циклі реплікації вірусу. Традиційно уживаний метод детекції вірусної інфекції за рівнем синтезу білка р24 у випробуваннях створеної нами конструкції не може відобразити реальної картини інфекційного процесу, оскільки до механізму біосинтезу цього білка вона прямого відношення не має. Білок р24 – продукт гена *gag* – є структурним групоспецифічним білком, що будує оболонку нуклеоїду ВІЛ і синтезується у великій кількості.

Реалізація функцій створеної нами конструкції відбувається у відповідь на появу в клітині ВІЛ, а саме – його раннього продукту білка Tat. Але цей білок активує ще й транскрипцію вірусного геному, внаслідок чого запускається синтез і інших вірусних білків, з-поміж яких продукти гена *gag*. Транскрипція власного геному ВІЛ припиняється через накопичення у клітині асРНК, але синтез р24 продовжуватиметься на РНК-транскриптах, які виникли в первинний період вірусної інфекції, до їхньої повної деградації. Оскільки збірка віріонів проходить на значно пізніших стадіях інфекційного процесу і визначається наявністю всіх структурних компонентів, синтез яких неодмінно залежить і від безперешкодного функціонування регуляторних ме-

ханізмів, пошкодження останніх антисенсовим впливом відбивається і на формуванні інфекційних вірусних часток. На нашу думку, саме такий перебіг подій віддзеркалюють одержані нами дані: показники виходу зрілого (інфекційного) ВІЛ у клітинах, трансфікованих антисенсовою конструкцією, виявляються у значно менших рівнях, ніж показники вмісту вірусспецифічного антигену р24.

Варто зазначити, що в клітинах, трансфікованих як антисенсовою плазмідною, так і контрольними векторними плазмідами, у разі культивування без селективного тиску суттєвого пригнічення вірусної репродукції не відмічено (рис. 5, в). Це зумовлено тим, що лише 3–5 % популяції інфікованих клітин забезпечені антисенсовим внутрішньоклітинним імунітетом. Більша частина клітин популяції не трансфікована, і за відсутності антиметаболіту (аміноглікозидного антибіотика) зберігає нормальний рівень життєздатності, а відтак і звичайну чутливість до ВІЛ-інфекції. За умов селективного тиску G418 частина клітин гине, у частини – метаболізм пригнічений: вони або мало придатні для підтримки вірусного репродуктивного циклу, або цей процес у них взагалі неможливий.

Враховуючи досягнуті позитивні результати з пригнічення *in vitro* реплікації ВІЛ у гемопоетичних клітинах людини, які несуть антисенсові векторні конструкції, є підстава очікувати, що за трансфузії таких клітин хворому на СНІД вони візьмуть на себе функції імунного захисту організму. Можна припустити також, що при заповненні кров'яного руслу стійкими до ВІЛ нащадками трансплантованих стовбурових кровотворних клітин і клітинпопередників кров реципієнта буде поступово звільнятися від збудника.

З огляду на наявність у трансфікованих клітинах деякого вмісту вірусного білка р24 (та неодмінно й інших білків), а також слідового рівня появи зрілих віріонів, можна сподіватися, що протягом такого контрольованого інфекційного процесу в організмі відбуватиметься напрацювання протівірусних антитіл, яке сприятиме формуванню власного імунного захисту. Якщо передбачені ефекти матимуть місце в організмі пацієнта, можна очікувати, що трансплантація стійких до ВІЛ гемопоетичних клітин продовжить йому життя або хоча б полегшить страждан-

ня. Підтвердити (або спростувати) висловлені вище припущення можуть результати клінічних випробувань створеної системи для генної терапії СНІДу.

Отже, результатом проведених досліджень є розробка системи для генної терапії СНІДу, яка являє собою гемопоетичні клітини людини з набутим внутрішньоклітинним імунітетом проти ВІЛ. Основою такого імунітету є молекулярна генетична конструкція, побудована з використанням ААВ-вектора, яка несе в собі похідну від LTR ВІЛ транскрипційну одиницю, здатну до індукованого синтезу в клітині асРНК, спрямованих проти ключових генів ВІЛ *tat* і *rev*. Індукування синтезу антисенсових транскриптів здійснюється ВІЛ-специфічними білками в ранній період після інтервенції збудника в клітину. Створену антисенсову систему можна використати для проведення подальших доклінічних випробувань.

Результати, одержані при виконанні представлених досліджень, стали основою кандидатської і докторської дисертацій, висвітлені в шести публікаціях та представлені на трьох наукових форумах.

A. D. Shved, O. P. Kukhareenko

Development of the system for gene therapy of AIDS on the basis of antisense RNAs

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Based on adeno-associated virus derived plasmid construct that are able to synthesize in cells antisense RNAs directed against key genes of HIV. Gematopoietic human cells carrying the created structure, acquired resistance to HIV infection, as evidenced by the reduction in infectious titer of HIV in cell culture. The resulting system of intracellular resistance to retrovirus can be seen as a model of gene therapy of AIDS.

Keywords: HIV-AIDS, adeno-associated virus, antisense RNAs, gene therapy, gematopoietic human cells.

A. Д. Швед, А. П. Кухаренко

Создание системы генной терапии СПИДа на основе антисмысловых РНК

Резюме

На базе аденоассоциированного вируса получена плазмидная конструкция, способная синтезировать в клетке антисмысловые РНК, направленные против ключевых генов ВИЧ. Гемопоетические клетки человека, несущие созданную конструкцию, приобрета-

ют устойчивость к ВИЧ-инфекции, о чем свидетельствует снижение инфекционного титра ВИЧ в культуре клеток. Полученную систему внутриклеточной резистентности к ретровирусу можно рассматривать как модель генотерапии СПИДа.

Ключевые слова: СПИД-ВИЧ, аденоассоциированный вирус, антисмысловые РНК, генная терапия, гемопоетические клетки человека.

REFERENCES

1. Baltimore D. Intracellular immunization // *Nature*.—1988.—**335**, N 6189.—P. 395–396.
2. Colman A. Antisense strategies in cell and developmental biology // *J. Cell Sci.*—1990.—**97**, Pt 3.—P. 399–409.
3. Yu M., Poeschla E., Wong-Staal F. Progress toward gene therapy for HIV infection // *Gene Ther.*—1994.—**1**, N 1.—P. 13–26.
4. Mosca J. D., Ritchey D. W., d'Arcy L. A., Burke D. S., The Henry M. Jackson. Expression of anti-HIV compounds directed from the HIV-LTR: a potential gene therapy for HIV infected individuals // 6th Int. AIDS Conf.—San Francisco, 1990.—P. 107.
5. Muzycka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*—1992.—**158**.—P. 97–129.
6. Nahreini P., Woody M. J., Zhou S. Z., Srivastava A. Versatile adeno-associated virus 2-based vectors for constructing recombinant virions // *Gene*.—1993.—**124**, N 2.—P. 257–262.
7. Sczakiel G., Oelze I., Rittner K. Microinjection: a technique to study inhibition of HIV-1 replication mediated by antisense RNA and parvovirus genes // *Biotechnology applications of microinjection, microscopic imaging, and fluorescence* / Eds P. H. Bach et al.—New York: Plenum Press, 1993.—P. 1–10.
8. Antoni B. A., Rabson A. B., Miller I. L., Trempe J. P., Chejanovsky N., Carter B. J. Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells // *J. Virol.*—1991.—**65**, N 1.—P. 396–404.
9. Sczakiel G., Oppenlander M., Rittner K., Pawlita M. Tat- and Rev-directed antisense RNA expression inhibits and abolishes replication of human immunodeficiency virus type 1: a temporal analysis // *J. Virol.*—1992.—**66**, N 9.—P. 5576–5581.
10. Rittner K., Heilbronn R., Kleinschmidt J. A., Sczakiel G. Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78rep/p68rep and the HIV-1 long terminal repeat // *J. Gen. Virol.*—1992.—**73**, Pt 11.—P. 2977–2981.
11. Sullenger B. A., Gallardo H. F., Ungers G. E., Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication // *Cell*.—1990.—**63**, N 3.—P. 601–608.
12. Graham G. J., Maio J. J. RNA transcripts of the human immunodeficiency virus transactivation response element can inhibit action of the viral transactivator // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1990.—**87**, N 15.—P. 5817–5821.

Received 02.04.13